

На правах рукописи

ВАРЛАМОВА РЕГИНА МАРКОВНА

**ГРУППОВОЕ И ИНДИВИДУАЛЬНОЕ ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ
СОЕДИНЕНИЙ С АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань –2007

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина” Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель: доктор химических наук,
профессор Э.П. МЕДЯНЦЕВА

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
С.Ю. ГАРМОНОВ

кандидат химических наук,
доцент, М.П. КУТЫРЕВА

Ведущая организация: Казанский государственный
технический университет им. А.Н. Туполева

Защита диссертации состоится «31» мая 2007 г. в 14.00 на заседании диссертационного Совета К 212.081.04 по химическим наукам Казанского государственного университета по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М Бутлерова, Бутлеровская аудитория

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им.
Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 420008, г. Казань,
ул. Кремлевская, 18, КГУ, Служба аттестации научных кадров

Автореферат разослан «_____» апреля 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,
кандидат химических наук

Шайдарова Л.Г.

Актуальность темы. Разработка простых, экспрессных и в то же время чувствительных и селективных способов определения широкого круга биологически активных соединений - задача, которая была, есть и будет актуальной еще долгое время.

Зачастую, на стадии предварительных испытаний, отсутствует необходимость определять конкретное соединение и можно ограничиться информацией о наличии соединений определенного класса, т.е. получить сигнал «есть-нет», например, относительно потенциальных загрязнителей в объекте анализа. Это может послужить основанием для оперативного принятия соответствующих природоохранных мер и лишь затем, при необходимости, выявить конкретный загрязнитель, что всегда сопряжено с дополнительными материальными и временными затратами.

Концепция обобщенных показателей и группового анализа, характеризующих состояние анализируемых объектов, которые в ряде случаев предшествуют определению индивидуальных соединений, находит все больше сторонников среди исследователей. При гораздо меньших затратах групповой анализ позволяет получить результат, который можно использовать в практических целях и который, в целом, определяет общую стратегию дальнейшего исследования.

Один из путей решения этой проблемы – разработка новых способов анализа, новых тест-систем, которые в зависимости от принципа действия, используемых химических реагентов, состава, условий проведения определений и способа получения информации, позволяют найти подходы к анализу объектов неизвестного состава, что по-прежнему составляет одну из сложнейших задач аналитической химии.

Цель исследования: разработка подходов и методических приемов для создания комбинированного способа определения класса (группы) биологически активных веществ (пестициды, лекарственные препараты) и последующего определения индивидуальных соединений в сложных по составу объектах, путем иммуноэкстракции определяемых соединений с помощью иммобилизованных антител (сорбентов) с последующим определением амперометрическими биосенсорами.

Научная новизна. Предложен методический подход, основанный на иммуноэкстракции сначала группы соединений одного класса (групп-специфичный анализ), а затем иммуноэкстракции отдельных представителей этого класса соединений (индивидуальный анализ), осуществляемый за счет сочетания специфичности действия иммобилизованных сорбентов различной природы (антитела, полимеры с молекулярными

отпечатками) и амперометрических биосенсоров. Рассчитаны количественные характеристики процесса иммуноэкстракции пестицидов и антидепрессантов разных классов с помощью иммобилизованных антител. Оценена возможность использования иммобилизованных полимеров с молекулярными отпечатками как альтернатива иммобилизованным антителам для определения гербицида 2,4–Д. Показана возможность концентрирования, исходя из максимальной сорбционной емкости иммобилизованных антител и полимеров с молекулярными отпечатками и величины отклика холинэстеразного биосенсора.

Для реализации предлагаемого способа определения антидепрессантов разработаны новые амперометрические биосенсоры на основе иммобилизованной моноаминоксидазы, печатных платиновых и стеклоглеродного электродов, в основу функционирования которых положены сочетание реакции окислительного дезаминирования биогенных аминов и электрохимического окисления продуктов их ферментативной реакции. Показана возможность оценки количественного содержания антидепрессантов разных классов по их ингибирующему действию на иммобилизованную моноаминоксидазу. Рассчитаны кинетические параметры реакции окислительного дезаминирования дофамина в отсутствие и в присутствии различных концентраций ингибиторов моноаминоксидазы.

Предложен алгоритм проведения иммуноэкстракционных определений биологически значимых веществ в образце неизвестного состава с помощью иммобилизованных антител разной специфичности действия и амперометрических биосенсоров.

Практическая значимость. Предложен комбинированный способ анализа, представляющий собой новое решение задачи селективного и высокочувствительного определения группы соединений и (или) отдельного соединения в сложной по составу смеси, в присутствии родственных по структуре и свойствам соединений, что невозможно с использованием других приемов и подходов. Разработана методика иммунохимического определения как группы триазиновых гербицидов, так и их отдельных представителей в продуктах питания, гербицида 2,4–дихлорфеноксиуксусной кислоты в молоке с использованием полимера с соответствующими молекулярными отпечатками.

Разработан вариант иммунохимического определения трициклических антидепрессантов с использованием иммобилизованных антител и амперометрических моноаминоксидазных биосенсоров. Проведена апробация разработанных биосенсоров при определении лекарственных соединений (пиразидола и флуоксетина) в фармпрепаратах и дезипрамина в сыворотке крови.

Показаны перспективы практической реализации предлагаемого комбинированного способа определения биологически активных веществ в виде тест-систем для группового и

индивидуального иммуноэкстракционного определения пестицидов, лекарственных соединений с амперометрическим детектированием.

На защиту выносятся:

- Результаты изучения сочетания иммуноэкстракции группы триазиновых гербицидов, нескольких антидепрессантов с помощью соответствующих иммобилизованных Ат разной специфичности действия, а также отдельных представителей определяемых классов соединений с последующим детектированием амперометрическими биосенсорами (холинэстеразным, моноаминоксидазным).
- Количественные характеристики и аналитические возможности иммуноэкстракции (сорбции, десорбции) и концентрирования с помощью иммобилизованных антител и полимеров с молекулярными отпечатками.
- Модели амперометрических моноаминоксидазных биосенсоров на основе различных физических преобразователей – платиновых печатных и стеклоуглеродного электродов для определения антидепрессантов разных классов.
- Кинетические параметры реакции окислительного дезаминирования дофамина в присутствии антидепрессантов.
- Константы образования иммунных комплексов и оценка перекрестной реактивности используемых антител к антидепрессантам.
- Методики определения группы триазиновых пестицидов, отдельных представителей гербицидов триазинового ряда, гербицида 2,4–Д в пищевых продуктах, антидепрессантов в лекарственных формах (пиразидол, флуоксетин) и в биологических жидкостях (дезипрамин).

Апробация работы: Материалы диссертации докладывались и обсуждались на Всероссийской конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика И.П. Алимарина "Аналитика России" (Москва, 2004), II Международном симпозиуме "Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии" (Краснодар 2005), Всероссийской научной конференции с международным участием "Электроаналитика-2005" (Екатеринбург, 2005 г.), Международной научной конференции "Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий" (Томск 2006), итоговой научной конференции Казанского государственного университета (2006), VI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века", Российской школе – конференции молодых ученых "Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии" (Пущино 2006).

Работа проводилась при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 03-03-33116.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 17 работ. Из них 5 статей (2 из них включены в перечень ВАК) и 12 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях. 2 статьи приняты к печати.

Структура и объем работы: Диссертация изложена на 151 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц и 14 рисунков. Работа состоит из введения, семи глав, выводов и списка литературы, включающего 163 ссылки.

Первая глава литературного обзора посвящена современным методам определения триазиновых и хлорорганических пестицидов: твердофазной экстракции, иммунохимическому анализу, применению сенсорных устройств и полимеров с молекулярными отпечатками.

Во второй главе литературного обзора описаны современные методы анализа лекарственных соединений на примере антидепрессантов.

Третья глава содержит постановку задачи, методы и условия эксперимента.

Четвертая глава посвящена разработке принципов комбинированного способа анализа за счет сочетания иммуноэкстракции группы триазиновых гербицидов с помощью иммобилизованных Ат, их отдельных представителей с последующим детектированием амперометрическим холинэстеразным биосенсором.

В пятой главе представлены результаты использования иммобилизованных полимеров с молекулярными отпечатками для определения гербицида 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты, как альтернатива иммобилизованным антителам.

В шестой главе нашли отражение результаты, связанные с дальнейшим развитием описанных ранее (глава 4) подходов и приемов на примере иммуноэкстракционного определения антидепрессантов. Представлены результаты разработки новых амперометрических биосенсоров на основе иммобилизованной моноаминоксидазы и планарных платиновых или стеклоуглеродного электродов, их аналитические возможности. Описаны методики определения отдельных антидепрессантов в фармпрепаратах и биологических жидкостях.

Седьмая глава посвящена перспективам практической реализации предлагаемого комбинированного способа определения биологически активных веществ в виде тест-систем.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования использовали хроматографически чистые: симазин, атразин, пропазин, 2,4 – Д, дезипрамин, имипрамин, нортриптилин, флуоксетин, пиразидол,

соответствующие антитела к ним (предоставлены проф. С.А.Ереминым, каф. химической энзимологии МГУ) и полимеры с молекулярными отпечатками (ПМО) на 2,4-Д (предоставлены проф. С.Г.Дмитриенко, каф. аналитической химии МГУ). Для определения нескольких представителей одного класса соединений использовали или полиспецифичные Ат (антидепрессанты), или смесь Ат против отдельных соединений (триазиновые гербициды). Применяли бутирилхолинэстеразу (БуХЭ) сыворотки крови лошади с активностью 30АЕ/мг и моноаминоксидазу из мозга человека с активностью 0.075 мкм/мин×мг (предоставлена доц. А.Н.Фаттаховой, каф. биохимии КГУ). В качестве субстратов использовали бутирилтиохолин иодид (БТХИ) и 0.5% раствор дофамина. Для иммобилизации моноаминоксидазы в качестве матрицы использовали пищевой желатин марки П – 11. Применяли промышленно изготовленные нитрат целлюлозные (НЦ) мембранные фильтры фирмы "Сарториус", Германия. Для иммобилизации ПМО использовали нитрат целлюлозу типа колоксилин. Применяли 12.5%-ный раствор глутарового альдегида и сывороточный альбумин человека (ЧСА).

Основой холинэстеразных и моноаминоксидазных биосенсоров служила система, состоящая из платинового, вспомогательного электродов и электрода сравнения, полученная на керамической подложке методом печатных технологий (фирма BVT Technologies, Брно, Чехия). Объем рабочей ячейки системы составлял 200 мкл. Измерения проводили с помощью многоцелевого электрохимического детектора "МЭВ" с компьютеризированным управлением.

Отдельные контрольные опыты проводили с использованием стационарных платинового, ртутно-пленочного с серебряной подложкой, стеклоуглеродного электродов на осциллографическом полярографе ПО-5122 модели 03 и вольтамперометрическом анализаторе "Экотест-ВА" (Россия).

ВОЗМОЖНОСТИ ГРУППОВОГО И ИНДИВИДУАЛЬНОГО ИММУНОЭКСТРАКЦИОННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИАЗИНОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ С АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Для оценки возможности проведения группового анализа триазиновых пестицидов были использованы модельные растворы, в состав которых входили симазин и атразин при различных соотношениях (1:1, 1:10, 10:1), в различных диапазонах концентраций и холинэстеразные биосенсоры на основе печатных платиновых электродов. В основе формирования аналитического сигнала холинэстеразного биосенсора лежит сочетание реакции ферментативного гидролиза БТХИ и электрохимической реакции окисления продукта гидролиза субстрата, что регистрируется при потенциале +0.55 В.

Уменьшение величины аналитического сигнала в присутствии изучаемых гербицидов указывает на ингибирующее действие их на ИХЭ, входящую в состав биочувствительной части амперометрического биосенсора на основе печатных электродов, что наблюдается в определенном диапазоне концентраций (табл. 1).

Таблица 1

**Аналитические возможности определения триазиновых гербицидов
холинэстеразными биосенсорами на основе планарных платиновых электродов**

| Гербициды (соотношения концентрации) | Область рабочих концентраций, моль/л | Уравнение градуировочной зависимости $I^* = A + B \lg C$ и коэффициент корреляции r | | | % ингиби рования |
|--|---|---|----------------------------------|--------|---------------------|
| | | $A \pm \delta$ | $(B \pm \delta) \times (-\lg C)$ | R | |
| Симазин | $1 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-12}$ | (107 ± 3.5) | $(-9.1 \pm 0.4) \times (-\lg C)$ | 0.9947 | 32.4 ± 0.6 |
| Атразин | $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-10}$ | (33.8 ± 0.9) | $(-2.6 \pm 0.1) \times (-\lg C)$ | 0.9984 | 25 ± 1 |
| (симазин: атразин) 1:1 | $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-11}$ | (46.6 ± 1.9) | $(-4.0 \pm 0.2) \times (-\lg C)$ | 0.9939 | 30.0 ± 0.6 |
| (симазин: атразин) 1:10 | $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-10}$ | (55.5 ± 0.9) | $(-4.9 \pm 0.1) \times (-\lg C)$ | 0.9992 | 25.4 ± 0.8 |
| (симазин: атразин) 10:1 | $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-11}$ | (79.1 ± 2.8) | $(-6.7 \pm 0.3) \times (-\lg C)$ | 0.9953 | 35 ± 1 |

$$*I = (I_p/I_0) \times 100\%$$

Полученные результаты показывают, что возможно одновременное определение как нескольких представителей гербицидов триазинового ряда, так и их отдельных представителей.

Повысить селективность определений можно, используя процессы иммуноэкстракции определяемых соединений с помощью иммобилизованных антител (ИАт), с последующей регистрацией степени протекания биоспецифических взаимодействий с помощью холинэстеразного биосенсора. В основу такого определения положены стадии образования и последующего разрушения иммунного комплекса Ат-пестицид.

Оценены некоторые параметры, характеризующие физико-химические свойства ИАт, от которых зависит эффективность экстракции (а также, в наших условиях, и концентрирования).

Установлено, что в диапазоне pH от 7 до 8,6 наблюдается практически полное извлечение смеси триазиновых гербицидов из анализируемого раствора даже при однократной иммуноэкстракции (рис.1). Образование иммунного комплекса лучше всего проводить в нейтральной среде при комнатной температуре.

На степень извлечения влияет время инкубации ИАт в исследуемом растворе. Для образования иммунного комплекса пестицид - ИАт необходимо не менее 5 мин. (рис.2), как в

случае определения смеси пестицидов, так и их индивидуальных представителей.

Сорбционную емкость (СЕ) ИАт мембраны оценивали, анализируя содержание гербицидов сорбированных ИАт и в равновесном растворе после иммуноэкстракции в оптимальных условиях, меняя количество введенного соединения (рис.3).

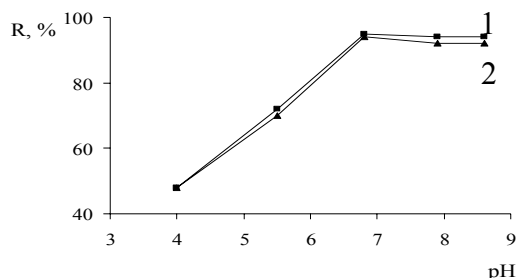


Рис. 1. Зависимость степени извлечения смеси гербицидов (1:1) (1) и симазина (2) от pH раствора, $C_{\text{гербицидов}} = 1 \times 10^{-7}$ М.

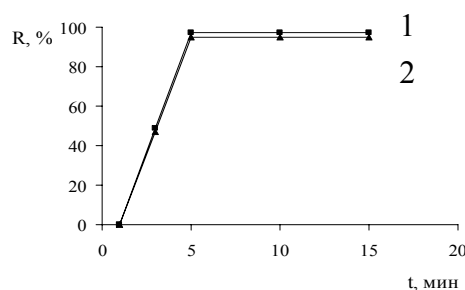


Рис. 2. Зависимость степени извлечения смеси гербицидов (1:1) (1), атразина (2) от времени образования иммунного комплекса, $C_{\text{гербицидов}} = 1 \times 10^{-7}$ М.

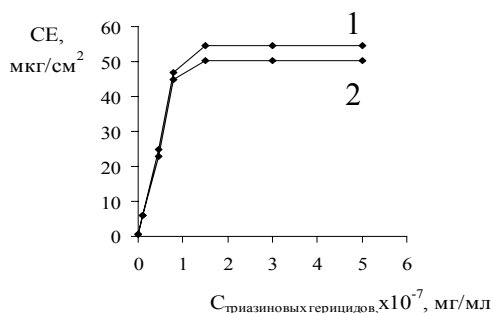


Рис. 3. Зависимость сорбционной емкости ИАт от концентрации симазина и атразина в соотношении 1:1 (1), симазина (2), pH 9.05

Характеристики процесса иммуноэкстракции приведены в табл. 2.

На практически полное извлечение симазина и атразина в выбранных условиях указывает и тот факт, что если в растворе дополнительно к исследуемым соединениям присутствует соизмеримая концентрация пропазина (также представитель группы 1,3,5-триазинового ряда) после иммуноэкстракции всегда наблюдался остаточный ингибирующий эффект иммобилизованной ХЭ, чего не наблюдалось в его отсутствии.

Таблица 2

Характеристики процесса иммуноэкстракции для группового и специфичного анализа триазиновых гербицидов (перемешивание, $T^{\circ}C=20$)

| Коэффициент распределения | Степень извлечения изучаемых гербицидов, %. | Максимальная сорбционная емкость ИАт, мкг/см ² | |
|---------------------------|---|---|------------------------------|
| | | Групповой анализ | Специфичный анализ (симазин) |
| 24 - 49 | 96±4 | 54,6±0,9 | 50,4±0,6 |
| | | | |

Присутствие в анализируемом растворе пестицидов другой группы, в частности, фосфорорганических пестицидов (например, паратиона), являющихся ингибиторами ХЭ,

также позволяет наблюдать остаточный ингибирующий эффект иммобилизованной ХЭ в растворе после иммуноэкстракции группы триазиновых гербицидов, чего не наблюдалось при контрольных экспериментах в его отсутствие.

Следует отметить, что вопросы концентрирования при использовании ИАт для извлечения исследуемого соединения на сегодняшний день практически не рассмотрены.

Установлено, что наряду с идентификацией группы пестицидов существует возможность концентрирования триазиновых гербицидов из их разбавленных растворов (в области концентраций 10^{-10} - 10^{-9} М из объема от 25 - 1000 мл) с помощью ИАт как в случае определения отдельных пестицидов, так и их смеси (табл.3). С целью изучения эффективности концентрирования рассмотрена зависимость коэффициента концентрирования от объема анализируемой пробы (см. табл.3). Установлено, что из 10^{-9} М раствора триазиновых гербицидов возможно концентрирование в 5–200 раз с помощью ИАт. Разработаны методики определения как группы триазиновых гербицидов, так и их отдельных представителей с помощью ИАт против триазиновых гербицидов и амперометрического биосенсора на основе печатных электродов в молоке, молочных продуктах и виноградном соке.

Для построения градуировочного графика определения триазинов в молоке использовали модельные растворы, приготовленные из сухого молока. Затем в молоко вводили определенное количество симазина и атразина. Перед стадией иммуноэкстракции образцы молока разбавляли в 10 раз. Дальнейшие операции проводили так же, как в случае определения триазиновых гербицидов в водных растворах. Правильность определений оценена способом “введено - найдено” (табл. 4).

Таблица 4

Определение гербицидов триазинового ряда в модельных образцах молока с использованием иммобилизованных антител и планарных электродов (групповой анализ) (n=6, p=0.95)

| Введено, моль/л смесь пестицидов: (симазин+атразин) | Найдено, моль/л смесь пестицидов: (симазин+атразин) | S_r |
|---|---|-------|
| 5×10^{-7} | $(4.8 \pm 0.6) \times 10^{-7}$ | 0.119 |
| 5×10^{-8} | $(4.3 \pm 0.6) \times 10^{-8}$ | 0.132 |
| 5×10^{-9} | $(4.6 \pm 0.7) \times 10^{-9}$ | 0.144 |

Проведенный анализ нескольких образцов молочных продуктов (кефир нежирный, производство Казанского молочного комбината "ВАМИН" и ООО "Эдельвейс-М", г. Казань, молоко пастеризованное 2.5% - Казанский молочный комбинат "ВАМИН",

Таблица.3.

Аналитические возможности концентрирования при определении микроколичеств гербицидов (n = 6, p = 0.95)

| Концентрация исходного раствора, моль/л | Объем исходного раствора, мл | Концентрация раствора после концентрирования (теоретическая), мл | Найдено, концентрация раствора после концентрирования ($\bar{x} \pm \delta$), моль/л | Sr | Степень концентри рования* | Коэффициент концентри рования, K |
|--|------------------------------------|---|--|-------|----------------------------------|--|
| Симазин: атразин 1:1 1×10^{-9} | 25 | 5×10^{-9} | $(4.8 \pm 0.7) \times 10^{-9}$ | 0.138 | 5 | 230 |
| | 35 | 7×10^{-9} | $(7.1 \pm 0.9) \times 10^{-9}$ | 0.120 | 7 | 327 |
| | 100 | 2×10^{-8} | $(2.5 \pm 0.4) \times 10^{-8}$ | 0.152 | 20 | 948 |
| | 500 | 1×10^{-8} | $(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-8}$ | 0.158 | 100 | 4692 |
| | 1000 | 2×10^{-7} | $(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-7}$ | 0.211 | 200 | 9493 |
| | | | | | | |
| Симазин- 1×10^{-10} | 25 | 5×10^{-10} | $(4.6 \pm 0.7) \times 10^{-10}$ | 0.144 | 5 | 23.7 |
| | 35 | 7×10^{-10} | $(6.7 \pm 0.9) \times 10^{-10}$ | 0.126 | 7 | 33.2 |
| | 100 | 2×10^{-9} | $(2.4 \pm 0.4) \times 10^{-9}$ | 0.158 | 20 | 95.1 |
| | 500 | 1×10^{-9} | $(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-9}$ | 0.172 | 100 | 470 |
| | 1000 | 2×10^{-8} | $(2.3 \pm 0.5) \times 10^{-8}$ | 0.206 | 200 | 950 |
| | | | | | | |
| 2,4 – Д 1×10^{-10} | 25 | 5×10^{-10} | $(5.3 \pm 0.7) \times 10^{-10}$ | 0.125 | 5 | 1.8 |
| | 35 | 7×10^{-10} | $(6.7 \pm 0.9) \times 10^{-10}$ | 0.127 | 7 | 2.6 |
| | 100 | 2×10^{-9} | $(2.2 \pm 0.4) \times 10^{-9}$ | 0.173 | 20 | 7.2 |
| | 500 | 1×10^{-9} | $(1.4 \pm 0.3) \times 10^{-9}$ | 0.203 | 100 | 35.8 |
| | 1000 | 2×10^{-8} | $(1.8 \pm 0.5) \times 10^{-8}$ | 0.264 | 200 | 71.6 |
| | | | | | | |

*Степень концентрирования = $C_{\text{после концентрирования}} / C_{\text{исходного раствора}}$

не пастеризованное - Верхнеуслонский район, Татарстан) показал практическое отсутствие в них триазиновых гербицидов ($< 10^{-11}$ М).

По такому же алгоритму проводилось определение триазиновых гербицидов в виноградном соке.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В НИТРАТ ЦЕЛЛЮЛОЗНУЮ МАТРИЦУ ПОЛИМЕРОВ С МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ОТПЕЧАТКАМИ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

В последнее десятилетие проявляется все возрастающий интерес к новому классу материалов - полимерам с молекулярными отпечатками (ПМО), что связано с наличием в составе ПМО высокоспецифических центров связывания, комплементарных по размеру, форме, структуре и физико-химическим свойствам различным органическим молекулам.

Представляло интерес оценить возможность использования вместо иммобилизованных антител ПМО для определения некоторых пестицидов, на примере определения производных хлорфеноксиуксусной кислоты.

Для решения поставленной задачи были получены образцы иммобилизованных в нитрат целлюлозную матрицу ПМО 2,4-Д на основе акриламида путем включения полимеров в состав матричного материала. Согласно литературным данным, используемые ПМО обладают селективной сорбционной способностью по отношению к 2,4-Д. Наилучшие условия получения иммобилизованных ПМО (ИПМО) представлены в табл. 5.

Таблица 5.

Условия получения иммобилизованных ПМО

| Используемые реагенты | | Количество реагента |
|-----------------------|-------------|---------------------|
| НЦ | | 0.05 г |
| Растворители | Бутилацетат | 1.2 мл |
| | Толуол | 0.7 мл |
| Количество ПМО | | 0.028 г |

Принцип предлагаемого способа определения гербицида основан на процессах сорбции, концентрирования и десорбции определяемого соединения с помощью иммобилизованных ПМО с последующим определением 2,4-Д амперометрическим холинэстеразным биосенсором, поскольку 2,4-Д имеет способность изменять (уменьшать) величину каталитической активности иммобилизованной ХЭ, входящей в состав холинэстеразных биосенсоров.

Сорбцию 2,4-Д проводили в кислой среде (рН=2) при комнатной температуре в течение 60 мин. Согласно литературным данным, десорбцию лучше всего проводить в присутствии того растворителя, в котором осуществляли синтез ПМО, а именно, в метаноле. Однако было установлено, что НЦ пленка с иммобилизованным ПМО частично растворялась в метаноле,

поэтому десорбцию проводили в растворе 0.01 – 0.1 М NaOH в течение 20 мин.

Наблюдается практически полное извлечение 2,4-Д из анализируемого раствора даже при однократной сорбции. Степень извлечения гербицида составляет в этих условиях не менее 96 ± 3 %. Было установлено, что максимальная концентрация, которая может быть сорбирована и, соответственно, определена с помощью полученных образцов ИПМО в наших условиях не превышает 1×10^{-8} моль/л (табл.6).

Максимальная сорбционная емкость ИПМО составляет $68,3 \pm 0,8$ мкг/см² (см. рис.4).

Некоторые характеристики процессов сорбции, десорбции представлены в таблице 6.

Таблица 6

Характеристики процесса сорбции

| | | |
|---|-------------------------------|-----------|
| Степень извлечения, %. | | 96±3 |
| Максимальная сорбционная емкость ИАт, мкг/см ² | | 68.3±0,8 |
| Процент перекрестных реакций ПМО 2,4 -Д, % | для бензойной кислоты | 0.96±0.04 |
| | для ацетилсалициловой кислоты | < 0.5 |
| | для дофамина | 1.00±0.02 |

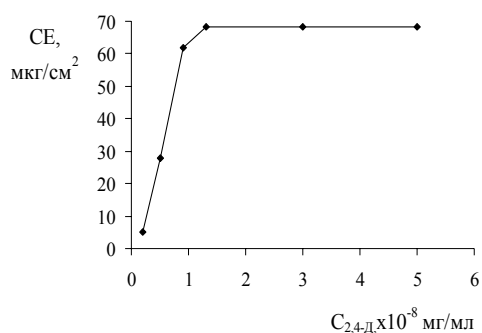


Рис.4. Зависимость сорбционной емкости ИПМО от концентрации 2,4 – Д, рН 9.05

В работах Дмитриенко С.Г. с сотр. показано, что ПМО 2,4 – Д лучше всего сорбируют то соединение, в присутствии которого они были синтезированы, а также некоторые структурные аналоги этих веществ, в число которых входили другие производные дихлорфеноксиуксусной кислоты, а также фенол и его хлорпроизводные. Представляло интерес рассмотреть в этом плане другие структурные аналоги 2,4-Д, а именно бензойную кислоту, ацетилсалициловую кислоту, дофамин (см. табл.6). Исходя из структуры

этих соединений, нельзя исключить возможность их сорбции на ПМО 2,4-Д. Судя по наблюдаемым эффектам, ПМО незначительно сорбируют указанные соединения.

Сопоставление свойств иммобилизованных ПМО и полимеров сравнения (ПС) показало, что при использовании иммобилизованных ПС в области концентраций 10^{-8} - 10^{-11} М 2,4-Д, заметная неспецифическая сорбция наблюдается только при концентрации 10^{-8} М и выше, которая не превышает 11 %. По-видимому, это связано с тем, что ПС не содержат высокоспецифических центров связывания (сайтов молекулярного распознавания).

Таким образом, неспецифическое связывание 2,4-Д ПС примерно в 10 раз меньше, чем специфическое связывание ПМО с соответствующими отпечатками.

Весьма удобно использовать ИПМО и для концентрирования определяемого соединения. В частности, показана возможность концентрирования 2,4-Д на уровне концентраций 1×10^{-10} моль/л в 5 -200 раз (см. табл.3).

Область рабочих концентраций в определении 2,4-Д с использованием ИПМО и холинэстеразным биосенсором составила 10^{-8} – 10^{-11} М. Правильность определений оценена способом “введено – найдено” (табл. 7).

Таблица 7

Определение 2,4-Д с помощью ИПМО и холинэстеразного биосенсора (n =6, p =0.95)

| Введено, моль/л | Найдено, моль/л | Sr |
|---------------------|---------------------------------|-------|
| 5×10^{-8} | $(5.1 \pm 0.6) \times 10^{-8}$ | 0.112 |
| 5×10^{-9} | $(4.9 \pm 0.7) \times 10^{-9}$ | 0.136 |
| 5×10^{-10} | $(5.3 \pm 0.8) \times 10^{-10}$ | 0.143 |

В качестве примера практического использования ИПМО, показана возможность определения 2,4-Д в молоке (табл.8).

Таблица 8

Определение 2,4-Д в модельных растворах и в молоке с помощью иммобилизованных ПМО и амперометрического холинэстеразного биосенсора (n=6, p=0.95)

| Введено, моль/л | Найдено, моль/л | Sr |
|---------------------------|---------------------------------|-------|
| 5×10^{-9} | $(5.1 \pm 0.6) \times 10^{-9}$ | 0.112 |
| 5×10^{-10} | $(4.8 \pm 0.6) \times 10^{-10}$ | 0.119 |
| 5×10^{-11} | $(5.2 \pm 0.7) \times 10^{-11}$ | 0.128 |
| Молоко” Эдельвейс“ | не обнаружено | |
| Молоке не пастеризованное | не обнаружено | |

Не обнаружено - $< 10^{-11}$ М

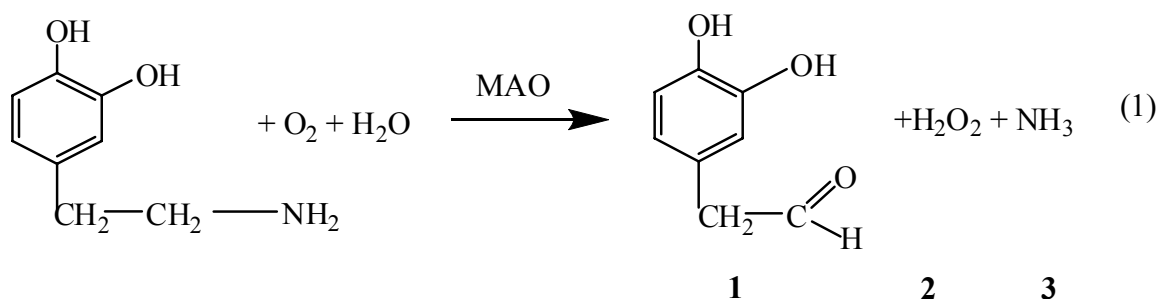
Полученные результаты показывают, что ИПМО могут быть использованы для селективного извлечения 2,4-Д. Их применение в ряде случаев может оказаться предпочтительнее, чем использование ИАт. В частности, ИПМО более устойчивы при высокой температуре, отличаются механической и химической устойчивостью в органических растворителях. Их получение – это чисто химический путь, который для химиков во многих случаях более удобен и предпочтителен.

МОНОАМИНООКСИДАЗНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ПОЛИСПЕЦИФИЧНОГО И ИНДИВИДУАЛЬНОГО ИММУНОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИДЕПРЕССАНТОВ

Методические приемы и подходы группового и индивидуального иммунохимического определения, разработанные на примере гербицидов триазинового ряда и хлорфеноксиксусной кислоты, нашли дальнейшее развитие при разработке иммунохимического способа определения некоторых лекарственных соединений.

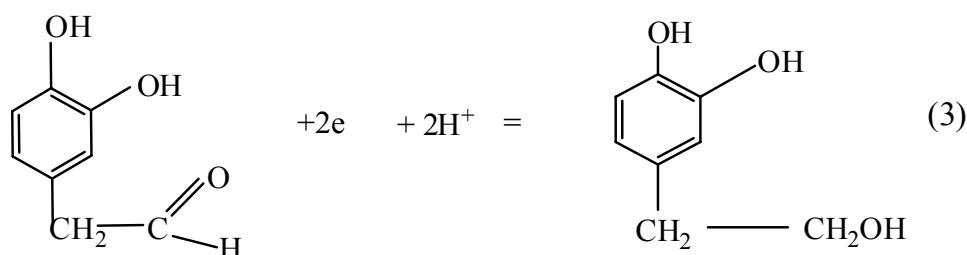
Согласно литературным данным, лекарственные соединения, относящиеся к классу антидепрессантов, обладают способностью избирательно ингибировать каталитическую активность такого жизненно важного фермента, как МАО. На этом основано их терапевтическое действие. Это создает предпосылки для разработки способов их определения с помощью соответствующих биосенсоров, в основу функционирования которых могут быть положены как раз эти процессы.

Продуктами реакции окислительного дезаминирования различных субстратов в присутствии МАО являются соответствующий альдегид (1), пероксид водорода (2) и аммиак (3). Электрохимическая активность, некоторых из них (1,2) может быть использована в аналитических целях для разработки амперометрических устройств, позволяющих регистрировать физиологически активные концентрации биогенных аминов (уравнение 1).



Сочетание реакции окислительного дезаминирования и электрохимической активности **1** и **2** продуктов реакции позволили разработать несколько новых амперометрических биосенсоров на основе иммобилизованной МАО для определения антидепрессантов. В роли электрохимически активной детектирующей системы выбрали фермент-субстратную систему МАО типа А – дофамин. В качестве физического преобразователя использовали стационарный ртутно-пленочный электрод (биосенсоры 1 типа), стеклоуглеродный (биосенсоры 2 типа), и платиновые планарные электроды (биосенсоры 3 типа).

В случае биосенсора 1 типа на осцилловольтамперограммах растворов дофамина в присутствии иммобилизованной МАО на фоне ацетатного буферного раствора рН 5.5 наблюдается аналитический сигнал при потенциале -1.55 В, который относится к восстановлению соответствующего альдегида до спирта (рис.5).



На вольтамперограммах раствора дофамина на печатном платиновом и стеклоуглеродном электродах на фоне ацетатного буферного раствора при потенциалах + 0.4 и + 0.45 В (рис.6, кривая 2, рис.7, кривая 1) наблюдается пик, высота которого зависит от концентрации дофамина в области концентраций 5×10^{-3} - 1×10^{-4} моль/л. Очевидно, в рассматриваемых условиях наблюдается электроокисление дофамина. В присутствии же иммобилизованной МАО в растворах дофамина можно наблюдать появление дополнительного аналитического сигнала при потенциале + 0.75 В и + 0.8 В для биосенсоров 2 и 3 типов соответственно, что соответствует пику окисления пероксида водорода (рис.6, 7 кривая 3, 2 соответственно).
$$\text{H}_2\text{O}_2 = \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e} \quad (2)$$

Большая разница в потенциалах (больше чем 0.3 В) позволяет получать аналитические сигналы достаточно хорошо различимые по потенциалам, что не мешает фиксированию каждого сигнала отдельно в присутствии другого.

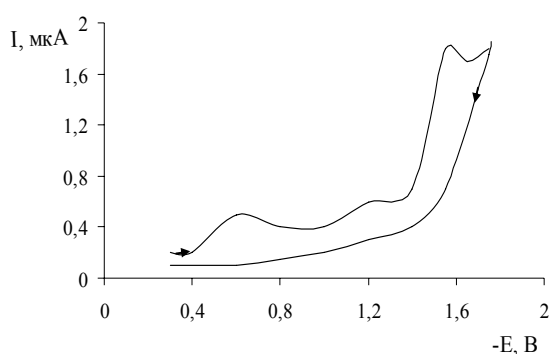


Рис.5. Вольтамперограммы ацетатного буферного раствора с рН 5.5, в присутствии раствора дофамина с концентрацией 1×10^{-3} М, и ИМАО (Биосенсор 1 типа)

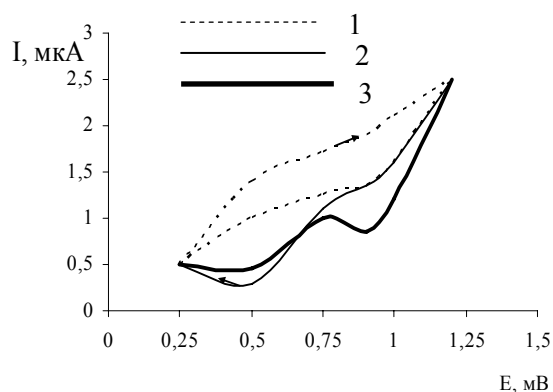


Рис 6. Вольтамперограммы ацетатного буферного раствора с рН 5.5 (1), в присутствии растворов дофамина с концентрацией 1×10^{-3} М (2), в присутствии ИМАО(3) (Биосенсор 2 типа)

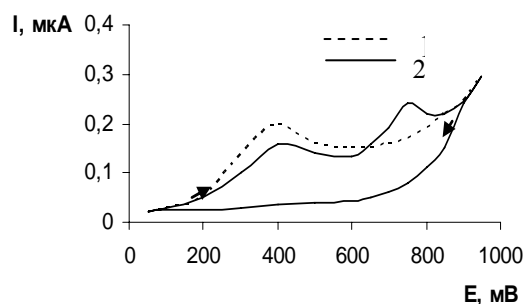


Рис.7 Вольтамперограммы растворов дофамина с концентрацией 1×10^{-3} М на фоне ацетатного буферного раствора с рН 5.5 в отсутствие (1) и в присутствии иммобилизованной МАО (2). $V = 20$ мВ/с. Биосенсор (3 типа)

Известно, что кислород воздуха легко окисляет гидрохиноновый фрагмент молекул катехоламинов. В щелочных средах окисление значительно ускоряется а иммобилизованная МАО проявляет наибольшую каталитическую активность именно в слабощелочной среде.

При рН 5.5 не наблюдается окисления самого дофамина, в то же время как иммобилизованный фермент проявляет еще достаточную

каталитическую активность. Именно поэтому все дальнейшие измерения проводились при этом значении pH фонового электролита. В результате изучения процесса электроокисления дофамина при различных концентрациях этого субстрата и пероксида водорода установлено, что наиболее удобный для расчетов аналитический сигнал (по величине и форме) наблюдался при концентрации субстрата 1×10^{-3} М. Выбранное значение концентрации субстрата использовали при всех измерениях и определениях с использованием моноаминоксидазных биосенсоров. Принципиальное устройство предлагаемых биосенсоров, характеристика их составных частей и условия их функционирования представлены в табл. 9.

Таблица 9

Амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры и условия их функционирования

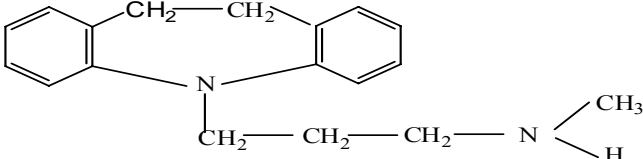
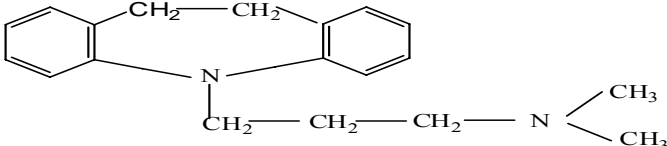
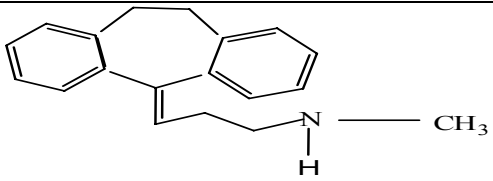
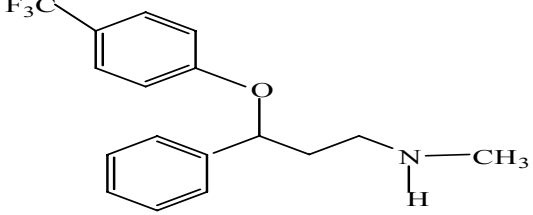
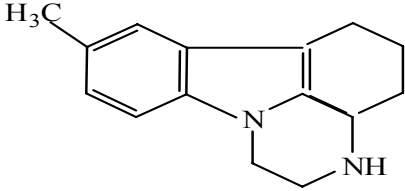
| Условия функционирования | Биосенсор 1 типа | Биосенсор 2 типа | Биосенсор 3 типа |
|---|---|---------------------------|--------------------------------|
| Трансдьюсер | Ртутно-пленочный электрод | Стеклоуглеродный электрод | Платиновые планарные электроды |
| Матричный компонент биочувствительной части сенсора | Бычий сывороточный альбумин | Пищевой желатин | Пищевой желатин |
| Потенциал аналитического сигнала | -1.55 В | +0.8 В | +0.75 В |
| Удельная каталитическая активность ИМАО | 0.06±0.01 мкмоль/мин. мг. | | |
| Концентрация субстрата(дофамина) | $(5 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-4})$ М | | |
| Фоновый электролит | Ацетатный буферный раствор pH 5.5±0.05 | | |

К соединениям, оказывающим влияние на каталитическую активность МАО, можно отнести например, трициклический антидепрессант дезипрамин, а также тетра- (пиразидол) и дициклические (флуоксетин) антидепрессанты (табл. 10).

Показано, что в присутствии дезипрамина, пиразидола и флуоксетина наблюдается уменьшение аналитического сигнала окисления пероксида водорода для биосенсоров 2 и 3 типов, и сигнала восстановления альдегида в случае биосенсоров 1 типа.

Согласно результатам кинетических исследований, на примере дезипрамина, в присутствии его различных концентраций наблюдается двупараметрически рассогласованное ингибирование, т.е. воздействие антидепрессанта ведет к снижению сродства субстрата и фермента и уменьшает скорость окислительного дезаминирования (табл.11).

Объекты исследования

| Антидепрессанты | |
|---|---|
|  | Дезипрамин (N-(3-Метиламинопропил)- иминодибензил) |
|  | Имипрамин (N-(3-диметиламинопропил)- иминодибензила гидрохлорид) |
|  | Нортриптилин (3-(10,11-дигидро-5Н-добензо[а,д]- циклогептен-5-илиден)-N-метил-1- пропанамин) |
|  | Флуоксетин ((±)-N-Метил-гамма-[4- (трифторметил)фенокси], бензолпропиламин) |
|  | Пиразидол (2,3,3а,4,5,6-Гексагидро-8- метил-1Н-пиразино-[3,2,1-і,k]- карбазола гидрохлорид) |

Аналитические возможности предлагаемых биосенсоров рассмотрены на примере определения этих антидепрессантов (табл.12, 13). Полученные результаты были использованы для разработки методики определения содержания пиразидола и флуоксетина в фармпрепаратах (табл. 14, 15).

Таблица 11

Кинетические параметры окислительного дезаминирования дофамина в присутствии иммобилизованной MAO и различных концентраций дезипрамина

Концентрация дофамина 1×10^{-3} , pH = 5.5

| Концентрация дезипрамина, моль/л | $K_m \times 10^5$, моль/л | $V_{max} \times 10^7$, моль/л×с | Соотношение параметров K_m и V_{max} | Тип ингибирования | K_i , моль ⁻¹ |
|--|-------------------------------|-------------------------------------|--|---------------------------------------|--------------------------------|
| 0 | 4.9 ± 0.3 | 7.5 ± 0.3 | | | |
| 10^{-4} | 1.2 ± 0.1 | 4.8 ± 0.3 | $K'_m < K_m$ | Двупараметрически рассогласованное | $(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-6}$ |
| 10^{-6} | 4.0 ± 0.2 | 4.4 ± 0.2 | $V'_{max} < V_{max}$ | | |

Таблица 12

Аналитические возможности определения антидепрессантов с помощью моноаминоксидазного биосенсора 3 типа

| Антидепрессант | Область рабочих концентраций, моль/л | Уравнение градуировочной зависимости $I^* = A + B \lg C$ и коэффициент корреляции r | | |
|----------------|---------------------------------------|---|------------------------------------|--------|
| | | $A \pm \delta$ | $(B \pm \delta) \times (-\lg C)$, | r |
| Дезипрамин | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$ | (2.37 ± 0.07) | $(-(0.32 \pm 0.01))(-\lg C)$ | 0.9984 |
| Пиразидол | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-7}$ | (-8 ± 1) | $(8.5 \pm 0.3)(-\lg C)$ | 0.9997 |
| Флуоксетин | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-9}$ | (25 ± 1) | $(-1.4 \pm 0.2)(-\lg C)$ | 0.9821 |

$$*I = (I_p/I_0) \times 100\%$$

Таблица 13

Аналитические характеристики амперометрических моноаминоксидазных биосенсоров при определении антидепрессантов

| Антидепрессант | Диапазон определяемых концентраций, моль/л | C_n , моль/л |
|-----------------------|--|---------------------|
| Биосенсоры 1 и 2 типа | | |
| Дезипрамин | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-7}$ | 8×10^{-8} |
| Пиразидол | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-6}$ | 8×10^{-7} |
| Флуоксетин | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-7}$ | 8×10^{-8} |
| Биосенсор 3 типа | | |
| Дезипрамин | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$ | 8×10^{-9} |
| Пиразидол | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-7}$ | 8×10^{-8} |
| Флуоксетин | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-9}$ | 8×10^{-10} |

Результаты определения флуоксетина сопоставлены с данными о содержании активного компонента лекарственного препарата, полученными с помощью биосенсоров 1 и 3 типов. Результаты эксперимента, представленные соответствующими выборками равнозначны, а их дисперсии однородны в диапазоне определяемых концентраций ($F_{\text{расч.}} < F_{\text{табл.}}$), расхождения между средними результатами незначимы ($t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$).

Для повышения селективности определения ингибиторов МАО проводили иммуноэкстракционное определение дезипрамина и нескольких трициклических антидепрессантов (дезипрамина, имипрамина и нортриптилина), включающее стадию твердофазной экстракции с помощью иммобилизованных полиспецифичных Ат, с последующим определением извлеченного из анализируемого раствора соединения амперометрическим моноаминоксидажным биосенсором (табл. 16).

Показано, что использование таких ИАт позволяет извлечь из анализируемого раствора сразу несколько веществ, обладающих сходным строением, т.е. после инкубирования раствора содержащего одновременно дезипрамин, имипрамин и нортриптилин (суммарная концентрация 10^{-7} моль/л) с ИАт, раствор уже не оказывал ингибирующего действия на ИМАО. В то же время присутствие в исследуемом растворе дополнительно к трициклическим антидепрессантам соизмеримых концентраций двуциклического

Таблица 14

Сопоставление результатов определения флуоксетина в фармпрепарате «Флуоксетин» с помощью моноаминоксидазных биосенсоров 1 и 3 типов (n=6, p=0.95), (Грасч (2.04) <Fтабл(6.39), трасч(1.33)<tтабл(2.78))

| Фармпрепарат (таблетки) | Содерж. по прописи, мг/мл | Амперометрические МАО биосенсоры | | | |
|-------------------------|---------------------------|--|-------|----------------------------------|-------|
| | | Стационарный ртутно-пленочный электрод | | Платиновый планарный электрод | |
| | | Найдено, моль/л | Sr | Найдено, моль/л | Sr |
| Флуоксетин (Канада) | 1×10^{-3} | $(0.96 \pm 0.06) \times 10^{-3}$ | 0.059 | $(0.98 \pm 0.07) \times 10^{-3}$ | 0.068 |

Таблица 15

Определение пиразидола с помощью МАО биосенсора 2 типа (n=6, p=0.95)

| Фармпрепарат (таблетки) | Содержание, (по прописи), мг/мл | Найдено, мг/мл | Sr |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------|
| Пиразидол (ОАО «Дальхимфарм») | 9.92×10^{-3} | $(9.8 \pm 0.9) \times 10^{-3}$ | 0.087 |

Таблица 16

Рабочие условия иммуноэкстракционного определения нескольких трициклических антидепрессантов

| | |
|--|----------------------------------|
| Разведение Ат | 1:20 |
| Среда для образования иммунного комплекса | pH = 7.0 ± 0.2 |
| Время образования иммунного комплекса Ат - Аг | 20 мин. |
| Раствор для разрушения иммунного комплекса | 0.02 М HCl + 0.15 М NaCl (pH=4). |
| Время разрушения иммунного комплекса | 15 мин. |

антидепрессанта флуоксетина, являющегося ингибитором МАО, позволяет наблюдать ингибирующий эффект раствора после иммуноэкстракции трициклических антидепрессантов ИМАО.

Все это указывает, с одной стороны, на возможность выделения с помощью иммуноэкстракции именно нескольких структурно родственных антидепрессантов (дезипрамин, имипрамин, нортриптилин), а с другой стороны - на практически полное извлечение трициклических антидепрессантов с помощью соответствующих Ат.

Характеристики процесса иммуноэкстракции представлены в табл. 17. Максимальную сорбционную емкость определяли из зависимости, аналогичной представленной на рис.4.

С целью разработки методов контроля за содержанием антидепрессантов в биологических жидкостях нами была предпринята попытка их определения в сыворотке

Характеристики процесса иммуноэкстракции

| | | |
|--|-------------------|--|
| Степень извлечения изучаемых антидепрессантов, %. | | 90±1 |
| Коэффициент распределения | | 8 - 10 |
| Максимальная сорбционная емкость ИАт, мкг/см ² | | 47±0,3 |
| Процент перекрестных реакций Ат к дезипрамину, % | для имипрамина | 10 |
| | для нортриптилина | 3 |
| | для флуоксетина | Взаимодействия не наблюдается |
| Константы связывания для иммунного комплекса [Ат-дезипрамин], моль ⁻¹ | | (2.6±0.1) × 10 ⁸ (4.0±0.2) × 10 ⁹ |

крови с помощью иммобилизованных Ат против трициклических антидепрессантов и моноаминоксидазного биосенсора 3 типа.

Методом "введено-найдено" установлено, что определение трициклических антидепрессантов в образцах сыворотки крови возможно с использованием градуировочного графика для его определения в воде. Это говорит о том, что в исследуемых условиях влияние матричных компонентов образца практически не сказывается. В качестве модельных образцов использовали сыворотку крови с введенной определенной концентрацией смеси антидепрессантов. Предварительными исследованиями было установлено, что используемая сыворотка не содержала других ингибиторов МАО. Для проведения иммуноэкстракции кровь для анализа разбавляли в 100 раз для уменьшения влияния матричных компонентов образца (табл. 18).

Таблица 18

Иммунохимическое определение дезипрамина в сыворотке крови с помощью моноаминоксидазного биосенсора 3 типа и иммобилизованных антител (n=5, p=0.95)

| Введено, моль/л | Найдено, моль/л | Sr |
|--------------------|--------------------------------|-------|
| 7×10^{-7} | $(6.7 \pm 0.3) \times 10^{-7}$ | 0.036 |
| 5×10^{-7} | $(4.8 \pm 0.2) \times 10^{-7}$ | 0.036 |
| 2×10^{-7} | $(2.3 \pm 0.1) \times 10^{-7}$ | 0.035 |

Анализируя полученные результаты можно отметить, что для практического определения антидепрессантов как в виде лекарственных препаратов, так и их содержания в биологических жидкостях, возможно использование всех трех типов разработанных амперометрических моноаминоксидазных биосенсоров.

Полученные результаты служат основой для разработки соответствующих тест-систем, состоящих из наборов для получения ИАт для групп-специфичного и индивидуального

определения биологически активных веществ по типу производимых в настоящее время коммерческих иммунотестов, наборов для получения соответствующих **амперометрических биосенсоров** и любого **регистрирующего устройства** для измерения тока при заданном потенциале. Предлагаемые тест – системы могут служить для скрининга объектов анализа и определения широкого круга биологически значимых веществ по разработанному для этих целей алгоритму.

Выводы

1. Предложен комбинированный способ анализа, основанный на сочетании иммуноэкстракции группы триазиновых гербицидов или нескольких антидепрессантов с применением соответствующих иммобилизованных Ат (групп-специфичный, полиспецифичный анализ), а также отдельных представителей определяемых классов соединений (индивидуальный анализ) с последующим детектированием амперометрическими холинэстеразным или моноаминоксидазными биосенсорами.
2. Определение группы триазиновых гербицидов и их отдельных представителей с помощью иммобилизованных Ат возможно в области концентраций 1×10^{-6} – 1×10^{-11} М, 2,4 – Д с использованием иммобилизованных в нитрат целлюлозную мембрану полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) - 1×10^{-8} – 1×10^{-11} М. Рабочие условия сорбции (иммобилизованные ПМО): рН=2, время 1 час и десорбции: 0.01 М NaOH, 20 мин.
3. Концентрирование триазиновых гербицидов с помощью ИАт и гербицида 2,4 –Д с помощью ИПМО в области концентраций от 10^{-9} до 10^{-10} М возможно в 5 –200 раз. Коэффициент концентрирования для смеси триазиновых гербицидов изменяется от 230 до 9500.
4. Разработаны амперометрические биосенсоры на основе платинового печатного и стеклоуглеродного электродов и иммобилизованной MAO для определения антидепрессантов:
 - предложен способ иммобилизации MAO;
 - выбраны условия формирования аналитического сигнала и функционирования биосенсоров: субстрат - раствор 1×10^{-3} М дофамина на фоне ацетатного буферного раствора с рН 5.5, потенциал регистрации аналитического сигнала 0.75 и 0.8 В соответственно.
5. Тетра- , три- и дициклические антидепрессанты оказывают ингибирующее действие на иммобилизованную MAO. Рассчитаны кинетические параметры реакции окислительного дезаминирования дофамина в присутствии ингибиторов MAO. Полиспецифичное определение трициклических антидепрессантов (дезипрамина, имипрамина, нортриптилина) с помощью моноаминоксидазного биосенсора возможно в области рабочих

концентраций 1×10^{-4} - 1×10^{-8} . Нижние границы определяемых содержаний составляют 8×10^{-9} (дезипрамин), 8×10^{-8} (пиразидол) и 8×10^{-10} (флуоксетин) моль/л.

6. Разработаны способы иммобилизации ПМО и Ат к трициклическим антидепрессантам, оценены параметры, характеризующие их физико-химические свойства:

- степень извлечения триазиновых гербицидов составляет 96 ± 4 % в области концентраций от 1×10^{-6} моль/л и ниже, степень извлечения 2,4 - Д - 96 ± 3 % в диапазоне концентраций от 1×10^{-8} моль/л и ниже, степень извлечения трициклических антидепрессантов - 90 ± 1 % в диапазоне концентраций от 1×10^{-4} моль/л и ниже;
- максимальная сорбционная емкость иммобилизованных Ат $54,6 \pm 0,9$ мкг/см² и $47 \pm 0,3$ мкг/см² (триазиновые гербициды и антидепрессанты) соответственно; максимальная сорбционная емкость иммобилизованных ПМО 2,4-Д составляет $68,3 \pm 0,8$ мкг/см²;
- константы связывания Ат к трициклическим антидепрессантам равны $(2.6 \pm 0.1) \times 10^8$ и $(4.0 \pm 0.2) \times 10^9$ моль⁻¹ (на примере дезипрамина).

7. Предложены методики иммунохимического определения группы триазиновых гербицидов, их отдельных представителей и гербицида 2,4-Д в пищевых продуктах, флуоксетина в фармпрепаратах и дезипрамина в сыворотке крови. Sr не более 0.14.

Основное содержание диссертационной работы изложено в следующих публикациях:
Статьи:

1. Медянцева Э.П. Иммуноэкстракционное концентрирование и определение симазина как представителя гербицидов группы сим-1,3,5-триазинов / Э.П.Медянцева, Р.М.Варламова, Д.Р.Биккенина, Г.К.Будников // Журнал прикладной химии. -2005. – Т.78, вып.7. – С.1122-1126.
2. Медянцева Э.П. Возможности группового иммуноэкстракционного определения триазиновых гербицидов с амперометрическим детектированием / Э.П.Медянцева, Р.М.Варламова, Д.Р.Биккенина, Г.К.Будников // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. -2006. – Т.72, № 10. – С.3-9.
3. Медянцева Э.П. Условия функционирования амперометрического биосенсора на основе моноаминоксидазы / Э.П.Медянцева, Р.М.Варламова, Д.А.Гималетдинова, А.Н.Фаттахова, Г.К.Будников // Ученые записки Каз. гос. ун - та. Естественные науки. – Т. 148, кн. 2. – 2006. – С. 21 – 29.
4. Медянцева Э.П. Возможности группового и индивидуального иммуноэкстракционного определения триазиновых гербицидов с амперометрическим детектированием / Э.П.Медянцева, Р.М.Варламова, Д.Р.Биккенина, Г.К.Будников // Аналитика и контроль. – Т. 10, № 2. – 2006. - С.159 – 167.
5. Медянцева Э.П. Аналитические возможности иммобилизованных в нитроцеллюлозную матрицу полимеров с молекулярными отпечатками дихлорфеноксисуксусной кислоты / Э.П.Медянцева, Р.М.Варламова, О.Г.Плотникова, Г.К.Будников, С.А.Попов, С.Г.Дмитриенко // Ученые записки Каз. гос. ун - та. Естественные науки. – Т. 149, кн. 1. – 2007. – С. 41 – 50.

Сборники научных трудов:

6. Варламова Р.М. Иммуноэкстракционное концентрирование и определение триазиновых гербицидов с амперометрическим детектированием: групповое и отдельных представителей / Р.М.Варламова, Э.П.Медянцева, Д.Р.Биккенина // Современные

проблемы теоретической и экспериментальной химии: межвузовский сборник научных трудов V Всероссийской конференции молодых ученых. / Научная книга. - Саратов, 2005. - С.110-112.

7. Варламова Р.М. Амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры разных типов в анализе фармацевтических препаратов и биологических жидкостях / Р.М.Варламова, Э.П.Медянцева, Д.А.Гималетдинова, Г.Г.Фазульязнова, А.Н.Фаттахова, Г.К.Будников // Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии: сб. ст. - Тула – Пушино, 2006. - С. 31-33.
8. Медянцева Э.П. Антидепрессанты пиразидол и флуоксетин как объекты анализа с помощью моноаминоксидазных биосенсоров / Э.П.Медянцева, Р.М.Варламова, Д.А.Гималетдинова, Г.Г.Фазульязнова, А.Н.Фаттахова, Г.К.Будников // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / ГФА, СПбГХФА. - Пятигорск, 2007. – вып.62. – С.260 – 261.

Тезисы докладов:

9. Варламова Р.М. Использование иммунохимических реакций в водно-органических средах и концентрирование микроколичеств пестицидов / Р.М.Варламова, Н.Ю.Ильичева, Э.П.Медянцева, Г.К.Будников // Тез. докл. Всероссийской конференции по аналитической химии "Аналитика России 2004". - Москва, 2004. - С. 349-350.
10. Варламова Р.М. Применение различных типов амперометрических биосенсоров для оценки иммуноэкстракционных характеристик и концентрирования на примере пестицида симазина / Р.М.Варламова, Э.П.Медянцева, Д.Р.Биккенина, Г.К.Будников // Тез. докл. Всероссийской научной конференции с международным участием "Электроаналитика-2005". – Екатеринбург, 2005. – С.75.
11. Варламова Р.М. Иммуноэкстракционное концентрирование и определение симазина как представителя гербицидов группы сим-1,3,5- триазинов / Р.М.Варламова, Э.П.Медянцева, Д.Р.Биккенина, Г.К.Будников // III Международная конференция "Экстракция органических соединений" ЭОС-2005. Каталог докладов. - Воронеж, 2005. - С.391.
12. Медянцева Э.П. Количественные характеристики процесса иммуноэкстракционного концентрирования как стадии электроиммуноанализа пестицидов / Э.П.Медянцева, Р.М.Варламова, Д.Р.Биккенина, Г.К.Будников // Материалы II Международного симпозиума "Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии". – Краснодар, 2005. – С.214-215.
13. E.P. Medyantseva Determination of some antidepressants using antibodies and amperometric monoaminoxidase biosensor / E.P.Medyantseva, R.M.Varlamova, D.A.Gimaletdinova, A.N.Fattakhova, H.C.Budnikov // ICAS - 2006, International congress on Analytical Science. - Moscow, Russia, 2006. - P. 565-566.
14. Варламова Р.М. Групповое и специфическое иммунохимическое определение некоторых биологически значимых соединений с использованием амперометрических биосенсоров / Р.М.Варламова, Э.П.Медянцева // VI Республиканская школа студентов и аспирантов "Жить в XXI веке", материалы конкурса "На лучшую студенческую работу". - Казань, 2006. - С. 80-82.
15. Гималетдинова Д.А. Амперометрические биосенсоры на основе иммобилизованной моноаминоксидазы для определения некоторых антидепрессантов / Д.А.Гималетдинова, Р.М.Варламова, Э.П.Медянцева // VI Республиканская школа студентов и аспирантов "Жить в XXI веке", материалы конкурса "На лучшую студенческую работу". – Казань, 2006. - С. 132-134.
16. Варламова Р.М. Амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры для определения антидепрессантов / Р.М.Варламова, Д.А.Гималетдинова, Г.Г.Фазульязнова // VI Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века", Тез. докл. - Казань, 2006. – С. 26.

17. Медянцева Э.П. Аналитические возможности амперометрических биосенсоров на основе иммобилизованной моноаминоксидазы / Э.П.Медянцева, Р.М.Варламова, Д.А.Гималетдинова, Г.Г.Фазульязнова, А.Н.Фаттахова, Г.К.Будников // Материалы Международной научной конференции "Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий". - Томск, 2006. – Том 2. - С.260-261.